

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

Le Titre de Docteur en Pharmacie, Diplôme d'Etat

par.

Geneviève AUBEL-LESURE

Lauréat de la Faculté de Pharmacie.

PREMIERE THESE.- Contribution à l'étude
de l'hémagglutination.

DEUXIEME THESE.- Propositions données
par la Faculté.

Soutenues le 2 Juin 1951 devant la Commission d'examen.

Monsieur le Doyen FABRE, Président.

M. le Professeur Paul FLEURY
Mlle LAMBIN, Maître de Conférences) Examinateurs.

1951

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

Le Titre de Docteur en Pharmacie, Diplôme d'Etat

par

Geneviève AUBEL-LESURE

Lauréat de la Faculté de Pharmacie.

PREMIERE THESE.- Contribution à l'étude
de l'hémagglutination.

DEUXIEME THESE.- Propositions données
par la Faculté.

Soutenues le devant la Commission d'examen.

Monsieur le Doyen FABRE, Président.

M. le Professeur Paul FLEURY
Mlle LAMBIN, Maître de Conférences) Examineurs.



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. René FABRE, Doyen.
DELABY, Assesseur.
G.CUVIER, Secrétaire.

MM. L.JEANDEL, Rédacteur princip. E.BUVAT, Commis.
A.QUILLIOT, Rédacteur. Mme M.L.ESPINASSE, Commis.
Mlle M.DENNY, Commis.

PROFESSEURS

MM. FABRE	Toxicologie.
DELABY	Pharmacie chimique.
.....	Microbiologie.
PICON	Chimie minérale.
MASCRE	Botanique.
FLEURY	Chimie biologique.
JANOT	Pharmacie galénique.
CHARONNAT	Chimie organique.
VALETTE	Zoologie appliquée.
BEDEL	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS	Histoire naturelle des médi- caments simples d'origine végétale.
GUILLOT	Physique.
GAUTIER	Chimie analytique.
RAOUL	Professeurs sans chaire.
DOMANGE	
CRÉTÉ	
COURTOIS	
<u>Doyen honoraire: M. RADAIS.</u>	

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut.
PERROT, COUTIERE, BOUGAULT, LUTZ, HERISSEY, LAUNOY,
SOMMELET.

MAITRES DE CONFERENCES

MORETTE	Sciences physiques et chimiques.
CAVIER	Sciences naturelles.
LAMBIN (Mlle)	Sciences naturelles.

TRUHAUT	Sciences physiques et chimiques.
MOREAU	Sciences physiques et chimiques.
GUY	Sciences physiques et chimiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

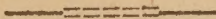
MM. CORRIEZ	Physique.
HARISPE, travaux pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON	Botanique.
GERMAIN	Microbiologie.
GIRARD	Chimie biologique.
MANGEOT	T.P. 4-ème année.
PIETTE	Biologie animale.
RENAULT H.	Chimie analytique.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. BARONNET	Pharmacotechnie chimique.
GOUTAREL	Pharmacotechnie galénique.
QUEVAUVILLER	Pharmacodynamie.

Bibliothécaire en Chef: M. GARNIER.

Bibliothécaires: (Mlle LAUD.
Mme KREHMER.



A mon mari.

A mes parents.

A Philippe.

A tous les miens.

A Monsieur le Doyen René FABRE

qui m'a fait le grand honneur d'accepter la
présidence de cette thèse. Hommage de ma
reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur FLEURY

en hommage de ma reconnaissance pour son
enseignement et ma très respectueuse gratitude.

A Mademoiselle LAMBIN, Maître de Conférences,

qui m'a appris à connaître et à aimer la sérologie.

A Monsieur le Professeur René WURMSER

qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire,
en témoignage d'une amitié vieille de trente ans.

A Madame Sabine FILITTI-WURMSER

qui s'est chargée de la tâche ingrate de m'apprendre
la technique de l'héماغglutination.

A tous les membres du laboratoire de Biophysique
du Professeur Wurmser, qui ont su m'entourer de l'atmo-
sphère amicale la plus propice au travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	page	1
PREMIERE PARTIE		
<u>Chapitre I</u> Généralités sur le complément ou alexine . .	"	5
<u>Chapitre II</u> Technique personnelle de dosage du complément . .	"	14
DEUXIEME PARTIE		
<u>Chapitre I</u> L'isohémagglutination . .	"	26
<u>Chapitre II</u> Etude de l'inhibiteur de l'isohémagglutination . .	"	28
TROISIEME PARTIE		
<u>Chapitre I</u> L'immunhémagglutination . .	"	35
<u>Chapitre II</u> Etude de l'inhibiteur de l'immunhémagglutination . .	"	56
CONCLUSIONS	"	61
BIBLIOGRAPHIE	"	63



INTRODUCTION

Par suite de leur importance théorique et pratique, les réactions d'agglutination ont donné matière à un nombre considérable de travaux. Malgré cela, leur étude quantitative a progressé très lentement, parce que les lois ordinaires des combinaisons chimiques auxquelles elles obéissent y sont généralement dissimulées par une extrême complexité. Les résultats récemment obtenus dans l'étude de l'isohémagglutination montrent que de tels phénomènes, si l'on réussit à en éliminer les complications contingentes, peuvent être traités selon les méthodes classiques de la chimie physique.

En 1946, S.Filitti-Wurmser et Y.Jacquot-Armand (1) ont mis en évidence par une méthode de numération globulaire la réversibilité de l'agglutination des hématies provenant d'individus du groupe sanguin B par des sérums du groupe A, et ces auteurs ont montré que le processus est exothermique. Millet et Hubimont ont confirmé (1950) (2) que l'optimum thermique des isoagglutinines est $+4^{\circ}\text{C}$. L'étude complète de l'isohémagglutination des hématies du groupe B au point de vue énergétique, c'est-à-dire la détermination des chaleurs de réaction, des constantes d'équilibre et des variations d'entropie correspondant à la fixation des agglutinines sur les agglutinogènes, a été entreprise par la suite (S.Filitti-Wurmser, Y.Jacquot-Armand et R.Wurmser, 1948, 1949, 1950) (3, 4, 5). Le résultat a été la découverte de nouvelles isohémagglutinines, caractérisées par leurs données énergétiques, c'est-à-dire en fin de compte par leurs natures chimiques qu'aucun procédé direct ne pouvait différencier jusqu'ici (6). Mais cette différenciation qui,

entre autres conséquences, conduit à d'intéressantes perspectives en génétique humaine, n'est possible qu'à condition de débarrasser les sérums d'un inhibiteur qui y est présent en quantité variable et dont l'action empêcherait la détermination des grandeurs énergétiques caractéristiques.

Cet inhibiteur s'est manifesté au cours de l'étude de l'isohémagglutination de la manière suivante: la concentration de l'agglutinine d'un sérum est déterminée en valeur relative par le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C, par mm^3 d'un mélange de sérum avec une suspension d'hématies. Ce nombre est désigné par le symbole N_4 . Puisqu'il est proportionnel à la concentration de l'isoagglutinine, il est substitué à celle-ci dans les expressions thermodynamiques employées dans le calcul des chaleurs de réaction et des constantes d'équilibre, qui servent à classer les diverses agglutinines. Mais il existe un autre moyen de différencier ces substances, c'est de déterminer le rapport du nombre N_4 au nombre N_{37} d'hématies agglutinées non plus à 4°C mais à 37°C. On peut montrer que ce rapport N_4/N_{37} s'écarterait toujours peu de l'unité, dans les conditions expérimentales, si le nombre moyen de molécules d'agglutinine fixées sur une hématie agglutinée était le même à toute température. Il n'en est pas ainsi et ce rapport lui aussi est caractéristique de la nature des agglutinines. Or, en faisant ces déterminations sur un grand nombre de sérums, il est apparu que le chauffage préalable à 56°C pendant 50 minutes des sérums modifie le rapport N_4/N_{37} , que la différence porte sur le nombre N_{37} des hématies agglutinées à 37°C et non sur le nombre N_4 ; enfin que pour tous les sérums d'un même génotype le rapport N_4/N_{37} obtenu après chauffage est une constante. Il était donc clair qu'il existait dans les sérums frais, en quantité variable, un inhibiteur dont l'action se fait sentir à 37°C, et non à 4°C. En fait, l'action de l'inhibiteur décroît avec la température mais est encore très sensible à 25°C par exemple.

hématies A₁ le pouvoir hémolytique du sérum baisse, tandis que le nombre maximum d'hématies qu'il peut agglutiner à 37°C augmente.

PREMIERE PARTIE

Chapitre I

Généralités sur le complément ou alexine.

En 1894, Pfeiffer injectait du vibrion cholérique dans le péritoine d'un cobaye préalablement vacciné contre le choléra; il constata que les microbes ne provoquaient pas la mort de l'animal, mais qu'ils subissaient dans la cavité péritonéale une série d'altérations morphologiques: perte de la mobilité, agglutination, fragmentation en granules, pour aboutir finalement à une dissolution complète.

En 1895, Mentchnikoff et Bordet constatent que ce phénomène se produit non seulement "in vivo" mais "in vitro" dans le sérum de l'animal vacciné. Dans une série d'expériences effectuées entre 1896 et 1900, Bordet (9) explique le mécanisme de cette action. Si on chauffe préalablement le sérum à 56°C pendant 30 minutes, on constate qu'il n'est plus capable de détruire les bactéries. Si on ajoute quelques gouttes d'un sérum neuf, la bactériolyse se produit. Il existe donc dans le sérum une substance douée de propriétés lytiques qui est détruite par le chauffage à 56°C. Cette substance seule ne peut lyser les bactéries, de même que le sérum neuf seul. D'autre part, si le sérum de l'animal vacciné a été chauffé à 65°C, il ne peut plus être réactivé par l'addition de sérum neuf. Il existe donc dans le sérum de l'animal vacciné une substance qui résiste au chauffage à 56°C et qui est détruite à 65°C. On peut donc conclure que la propriété lytique demande l'intervention de deux composés:

- un composé thermolabile qui existe dans tous les sérums, c'est l'alexine de Bordet et Buchner ou le complément d'Ehrlich;
- un composé thermostable qui existe seulement dans les sérums d'animaux vaccinés, et qui est spécifique, c'est la sensibilisatrice de Bordet ou l'ambocepteur d'Ehrlich.

Le mode d'action de ces deux composés est le même pour la bactériolyse ou l'hémolysé.

D'après Ehrlich, l'ambocepteur possède une double affinité à l'égard de l'antigène et du complément et il permet à celui-ci de se fixer sur l'antigène et de le détruire.

En 1907, Ferrata dialyse du complément contre de l'eau distillée et trouve que le précipité en résultant de même que la solution sont inactifs séparément mais provoquent l'hémolyse quand ils sont combinés.

En 1941, Pillemer, Ecker, Oncley et Cohn (10) publient une technique permettant de séparer le complément en ses composants. Ils appellent les deux fractions mises en évidence par Ferrata C'1 et C'2 ou "mid-piece" et "end-piece". De plus la levure de bière inactive une portion relativement thermostable du complément qu'ils appellent C'3 ou "third-component"; l'ammoniaque diluée détruit une autre partie du complément C'4 ou "fourth-component".

Le composant C'1 ou "mid-piece" est une euglobuline qui précipite quand du sérum frais est saturé de CO_2 et qui est inactivée par un chauffage de 30 minutes à 56°C . Dans la technique de fragmentation du sérum par l'alcool de Cohn, C'1 est concentré dans la fraction III 2 avec la thrombine. Il représente 0,6 pour 100 des protéines totales du sérum.

Le composant C'2 ou "end-piece" est une mucoglobuline; dans la technique de Cohn, il est concentré dans la fraction IV (α et β globulines); il est détruit par 30 minutes

de chauffage à 52°C, qui est sans action sur les trois autres. Il représente 0,2 pour cent des protéines totales du sérum et contient 10,3 pour cent d'hydrates de carbone.

Le composant C'3 ou "third-component" est relativement stable à la chaleur; il est spécifiquement inactivé par la levure qui est sans action sur les trois autres composants. Il est détruit par 30 minutes de chauffage à 36°C.

Le composant C'4 ou "fourth-component" est inactivé par l'ammoniaque ou l'hydrazine qui sont sans action sur les trois autres composants.

Le titre du complément est déterminé par le composant présent au plus bas titre. Les quatre composants sont indispensables pour les réactions d'hémolyse et de bactériolyse. On admet que le titre du complément humain est défini par C'2 et celui du complément de cobaye par C'3. Il peut arriver que dans le sérum humain C'3 soit en quantité plus faible que C'2.

Influence du complément sur l'agglutination des bactéries.

En 1931, P. Bruce White (11) a montré que le sérum normal de rat ou de lapin ajouté en quantité constante (1/10 ou 1/20) à des dilutions variées de sérums anti-Salmonella inhibe plus ou moins complètement l'agglutination somatique des bacilles homologues, mais est sans action sur l'agglutination flagellaire. Dans les Salmonella, l'antigène flagellaire ou H n'a aucune influence sur la virulence ou le pouvoir vaccinant de la bactérie. Il n'a également aucune action anti-infectieuse. La propriété due au sérum normal disparaît par un chauffage de 20 à 30 minutes à 56°C, en même temps que disparaît le complément hémolytique.

En 1949, Th. Thjötta et J. Jonsen (12) s'attachent à l'étude de l'agglutination des bacilles de Flexner et des Salmonella par les sérums antagonistes. Dans une première série

d'expériences sur des Bacilles de Flexner et l'immunsérum de lapin correspondant, ils notent le rôle inhibiteur du sérum frais de cobaye. Si, au lieu d'ajouter au mélange émulsion de Bacilles de Flexner - immunsérum, du sérum frais de cobaye, ils ajoutent du sérum de cobaye inactivé par 30 minutes de chauffage à 56°C, il n'y a pas inhibition de l'agglutination. Ces auteurs ont répété la même expérience avec Salmonella Typhi O et H. Ils ont ajouté dans le mélange antigène-anticorps-sérum de cobaye un système hémolytique et ils constaté qu'après l'agglutination le complément avait disparu et que, par conséquent, l'hémolyse ne se faisait plus.

Fixation du complément dans les réactions antigène-anticorps.

D'après Marrack et Heidelberger, un anticorps est un facteur bivalent capable de s'attacher lui-même à plusieurs molécules d'antigène. Quand l'anticorps et l'antigène sont en proportions idéales on obtient des précipités si l'antigène est soluble ou des agglutinats si l'antigène est insoluble. Si quelques facteurs interfèrent avec la fixation de l'anticorps à l'antigène, une inhibition de l'agglutination apparaît. On peut expliquer l'action du complément de trois façons différentes: le complément peut s'attacher lui-même à l'extrémité anticorps du composé; il peut s'attacher à l'extrémité antigène; il peut s'attacher au composé antigène-anticorps.

En 1942, Pillemer, Seifter et Ecker (13) ont montré quels étaient les composants du complément qui étaient fixés dans les réactions antigène-anticorps. Ils ont utilisé du complément de cobaye.

Dans les réactions anti-pneumocoque - polysaccharide spécifique du pneumocoque type III, voici quels sont les résultats obtenus:

Presque tout C'4 est fixé.

25 pour cent de C'3.

75 pour cent de C'1.

Presque tout C'2.

Dans les réactions qui mettent en jeu des hématies et du sérum anti-hématies, ils obtiennent les résultats suivants:

Presque tout C'4 est fixé.

C'3 n'est pas adsorbé du tout.

C'1 est adsorbé en quantités variables
suivant les sérums utilisés.

Presque tout C'2 est fixé.

Ils observent également qu'un excès d'anticorps ou d'antigène peut inhiber la fixation du complément. Mais pour le maximum de fixation du complément il faut un léger excès d'anticorps. Si on emploie des solutions trop diluées d'antigène ou d'anticorps, le composant C'4 ne se fixe pas complètement.

En 1945, Seifter, Ecker et Dozois (14) ont montré que l'inactivation spécifique de l'un des quatre composants du complément humain détruit complètement le pouvoir bactéricide du sérum qui réapparaît lorsqu'on ajoute le composant qui manque. Si la quantité de bactéries est suffisante et si le temps d'incubation est suffisamment prolongé, il y a perte complète de l'activité hémolytique du complément. Dans ce cas, ils ont trouvé que C'2 ou C'3 est complètement adsorbé.

Principe des méthodes de titrage du complément.

Pour produire l'hémolyse spécifique, il faut deux facteurs: le complément et l'anticorps ou hémolysine. De même que la bactériolyse, l'hémolyse témoigne de l'aptitude que possède le complément de se combiner au complexe antigène-anticorps. La facilité avec laquelle on peut suivre la réaction d'hémolyse fait qu'elle est toujours employée pour identifier le complément. Si le complément a déjà été fixé par des précipités spécifiques, il n'est plus disponible pour hémolyser les hématies sensibilisées (J.Bordet et O.Gengou) (15).

La plus petite quantité de sérum frais capable de

produire la lyse totale d'une quantité fixe d'hématies sensibilisées peut être prise comme unité. L'unité de complément ainsi définie est arbitraire: elle dépend du nombre d'hématies employées, de la quantité d'hémolysine, du volume total dans lequel on opère et de la concentration saline du mélange. Si on emploie des quantités de complément plus petites que l'unité, l'hémolyse est partielle; la relation entre la fraction d'hématies hémolysées et la quantité de complément employé n'est pas linéaire et se traduit par une courbe en S. De la forme de cette courbe, on déduit que l'hémolyse totale est approchée lentement et qu'il faut des augmentations de la concentration en complément très notables pour obtenir l'hémolyse des dernières portions d'hématies. Par contre, dans la région linéaire, la réaction est sensible à de petites différences dans la concentration du complément. L'emploi de l'hémolyse à 100 pour cent n'offre pas un moyen aussi sensible de dosage du complément que l'hémolyse à 50 pour cent, par exemple.

L'activité du complément, exprimée en unités 50 pour cent, peut être déterminée à partir des mesures des taux d'hémolyse variant entre 30 et 70 pour cent, effectuées avec des quantités variables de complément. Si l'on porte les taux d'hémolyse en ordonnée et les quantités de complément en abscisse, l'unité 50 pour cent se trouve à l'endroit où la courbe expérimentale coupe l'ordonnée 50 pour cent. La région de la courbe comprise entre les taux de 30 à 70 pour cent est presque linéaire.

A l'aide de l'équation de von Krogh (16), il est facile de mesurer l'unité 50 pour cent:

$$x = K \left(-\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$$

Dans cette relation, x exprime la quantité de complément nécessaire pour obtenir un taux d'hémolyse y . K est constant pour une même suspension d'hématies et dépend de la résistance des hématies sensibilisées. On donne à la constante

1/n qui détermine la forme de la courbe et dépend de l'homogénéité de la suspension la valeur de $0,2 \pm 10$ pour cent (moyenne de nombreuses expériences).

K représente l'unité 50 pour cent de complément, car à ce point $y = 0,5$ et $\frac{y}{1-y} = 1$. Donc $x = K$.

La formule de von Krogh a été dérivée d'une formule d'adsorption, modifiée à cause de l'inhomogénéité des hématies dans leur résistance à la lyse (Brooks) (17).

En 1946, Mayer, Eaton et Heidelberger (18) mettent au point une méthode quantitative de titrage du complément. Ils préparent à partir de sang défibriné de mouton ou de sang récolté sur solution d'Alsever (*) une suspension d'hématies à 5 pour cent. On compte à l'hématimètre le nombre d'hématies contenues dans cette suspension et on ajuste à 1.000.000 par mm^3 . On titre ensuite l'hémolysine en mélangeant 0,1 cm^3 de la suspension d'hématies à 1.000.000 par mm^3 et 0,1 cm^3 de diverses dilutions de sérum hémolytique. On ajoute 0,2 cm^3 de complément de cobaye à 1/20 et 0,4 cm^3 d'eau physiologique. On laisse 30 minutes à 37°C. Le taux d'hémolyse est déterminé au spectrophotomètre de Coleman. La plus haute dilution d'hémolysine donnant une lyse totale est prise comme unité. Pour l'emploi, les hématies sont sensibilisées en ajoutant volume égal d'une dilution d'hémolysine contenant 4 unités dans 0,1 cm^3 .

On procède ensuite au titrage préliminaire du complément, par la méthode de l'hémolyse 100 pour cent. On met 0,2 cm^3 d'hématies sensibilisées (soit 100 millions d'hématies) dans de petits tubes avec 0,075, 0,100, 0,125, 0,150 et 0,200 cm^3 d'une dilution 1/40 du sérum. On dilue avec de l'eau physiologique pour un volume total de 0,8 cm^3 . On laisse 30

(*) <u>Solution d'Alsever.</u>	Glucose	2,05 gr
	Citrate de sodium	0,80 gr
	Chlorure de sodium	0,80 gr
	Eau	q.s. pour 100 cm^3

Ajuster à pH 6,1 par l'acide ~~acétique~~ *citrique*.

On emploie volume égal de sang et de solution d'Alsever.

minutes à 37°C. Le degré de lyse de chaque tube est examiné. Le titre est obtenu en divisant le facteur indiquant la dilution par le volume qui produit la lyse totale; on a donc un titre de 400 à 200 unités par cm³.

On détermine ensuite l'unité 50 pour cent. Connaissant le titre du complément, on prépare une dilution convenable du sérum:

titre	400	320	270	200
dilution	1/35	1/25	1/20	1/15

Dans des tubes à hémolyse, on met 1,0 cm³ d'hématies sensibilisées avec 0,20, 0,25, 0,30, et 0,50 cm³ de la dilution et on complète à 4 cm³ avec de l'eau physiologique. On laisse 40 minutes à 37°C en fermant les tubes pour éviter l'évaporation. Les tubes sont ensuite centrifugés et le degré d'hémolyse du liquide surnageant est déterminé au spectrophotomètre. Dans le tube contenant 0,50 cm³ de sérum l'hémolyse doit être totale.

Sur du papier logarithmique, on met x en abscisse et $\frac{y}{1-y}$ en ordonnée. Les trois points, obtenus dans l'expérience, se placent sur une ligne droite. La valeur de x pour laquelle la droite coupe $\frac{y}{1-y} = \frac{0,5}{1-0,5} = 1$ représente l'unité 50 pour cent. La pente de la droite obtenue ($1/n$) doit être voisine de 0,2. Si la quantité de complément demandé pour l'unité 50 pour cent est égale à 1 et si $1/n = 0,2$, on peut substituer à l'équation de von Krogh la formule suivante:

$$x = \left(\frac{y}{1-y} \right)^{0,2}$$

A l'aide de cette formule, Mayer, Osler, Bier et Heidelberger (19) ont calculé des facteurs correspondant à tous les degrés de lyse compris entre $y = 0,10$ et $y = 0,90$, qui permettent de calculer la teneur en complément d'un sérum. Par exemple, si 1 cm³ d'une dilution à 1 pour cent de complément produit 30 pour cent d'hémolyse, l'activité sera égale à $100 \times 0,844 = 84,4$ unités, le facteur correspondant à $y = 0,30$.

étant 0,844..

Heidelberger et Mayer (20) ont également mis au point une autre méthode de dosage du complément, basée sur une technique dérivée de la microméthode de dosage de l'azote de Kjeldahl.

Des dosages d'azote sont effectués sur des mélanges contenant:

- a. antigène + complément
- b. anticorps + complément
- c. anticorps + complément inactivé
- d. antigène + anticorps + complément
- e. antigène + anticorps + complément inactivé
- f. antigène + anticorps

Le rapport $C' = d - (e-c) - (a+b)$ donne la teneur en azote du complément fixé dans la réaction. Malheureusement, le fait de pouvoir mesurer la quantité de complément fixé dans un précipité spécifique pour un volume donné de sérum de cobaye ne permet pas de calculer immédiatement la quantité de complément contenue dans 1 cm³ de sérum. La comparaison de nombreuses analyses montre que plus le volume de sérum de cobaye ajouté est grand, moins il y a d'azote fixé par cm³. Cette apparente solubilité nécessite une extrapolation au volume zéro. Quand cette dernière est faite, on voit que les valeurs en azote pour le complément s'établissent entre 0,04 et 0,06 mgr par cm³. Ce travail a été effectué en employant comme antigène le polysaccharide spécifique du pneumocoque type III et comme anticorps l'antisérum correspondant. Il a permis de déterminer la teneur en azote du complément de cobaye. De semblables analyses pour les compléments humains et de boeuf ont donné des valeurs comparables quoique le pouvoir hémolytique soit très différent. Ces différences doivent être rapportées aux proportions variables des divers constituants de ces trois compléments.

Chapitre II

Technique personnelle de dosage du complément.

Il m'a semblé qu'il serait intéressant de pouvoir exprimer la teneur en complément d'un sérum non en unités arbitraires, comme on le fait habituellement, mais par le nombre maximum d'hématies de mouton sensibilisées qu'il est capable d'hémolyser. C'est ce que je me suis efforcée de faire en mettant au point une méthode inspirée de la méthode quantitative de dosage de l'agglutinine de S.Filitti-Wurmser et Y.Jacquot-Armand (8) qui consiste à déterminer le nombre maximum d'hématies qu'un sérum peut agglutiner. Le taux d'agglutination est déterminé en faisant deux lectures à l'hématimètre la première étant celle des hématies contenues dans un mélange Hématies-solution tampon, la deuxième celle des hématies restées libres après agglutination par le sérum. La différence entre ces deux lectures donne le nombre d'hématies agglutinées. Le rapport $\frac{\text{hématies agglutinées}}{\text{hématies initiales}}$ donne le taux d'agglutination.

La méthode de dosage du complément consiste à déterminer le nombre maximum d'hématies de mouton qu'un sérum est capable d'hémolyser, en mettant en présence pendant 60 minutes à 37°C une quantité fixe de sérum et des quantités croissantes d'hématies de mouton sensibilisées.

Matériel biologique.

1. Le complément.

Le complément est apporté par du sérum humain ou du sérum de lapin. Le sérum humain est obtenu à partir du sang

prélevé stérilement sur des donneurs et centrifugé après douze heures de repos à 4°C, réparti ensuite en ampoules stériles et immédiatement congelé à -20°C. Le sérum est conservé gelé, sans qu'aucune baisse de titre soit observée, pendant plusieurs semaines.

Le sérum de lapin, obtenu par ponction veineuse ou cardiaque, est récolté stérilement et conservé dans les mêmes conditions que le sérum humain.

Au moment de l'emploi, le sérum est dégelé au bain-marie à 37°C.

2. Les hématies de mouton.

Elles sont recueillies stérilement et défibrinées par agitation avec des billes de verre, ou bien récoltées stérilement sur solution conservatrice de Wurmser (21):

Soude	1 gr
Acide citrique	3 gr
eau	100 gr
eau physiologique	100 gr

(On ajoute trois volumes de sang à deux volumes de cette solution).

Le sang est lavé trois fois avec de l'eau physiologique et ramené à son volume initial avec un tampon physiologique, de pH 7,3, dont voici la formule:

Chlorure de sodium	8 gr
Na ₂ HPO ₄ (12 OH ₂)	20,28 gr
KH ₂ PO ₄	1,35 gr
eau	q.s.pour 1000 Cm ³

3. Titrage de l'hémolysine et sensibilisation des hématies.

J'ai employé pour titrer l'hémolysine la technique de Mayer, Eaton et Heidelberger que j'ai exposée plus haut.

Les hématies de mouton sont sensibilisées en mélangeant parties égales d'une dilution de sérum hémolytique renfermant 5 unités hémolytiques dans 0,1 cm³ pour une suspension d'hématies contenant 1.000.000 d'hématies par cm³. Si la sus-

pension d'hématies est plus concentrée, on augmente la concentration en unités hémolytiques du sérum hémolytique. On laisse 10 minutes à 37°C et on porte à 4°C.

Technique.

Pour chaque expérience on utilise quatre tubes. Dans chacun d'eux, on met 0,4 cm³ de la suspension d'hématies. On ajoute dans deux tubes 0,4 cm³ de sérum et 0,2 cm³ d'eau physiologique. Ces tubes sont mis pendant une heure à 37°C, puis portés à la glacière. Le degré d'hémolyse est déterminé en comptant à l'hématimètre le nombre d'hématies non hémolysées. Par différence avec le nombre d'hématies contenues dans les deux autres tubes renfermant 0,4 cm³ de la suspension d'hématies et 0,6 cm³ d'eau physiologique, on obtient le nombre d'hématies hémolysées par le sérum.

J'ai comparé les résultats à ceux obtenus en déterminant l'hémolyse par titrage au spectrophotomètre de Jobin et Yvon de l'hémoglobine contenue dans le liquide après centrifugation des tubes. Les résultats donnés dans le tableau 1 montrent que les deux méthodes donnent des résultats comparables. Il m'a semblé plus pratique d'utiliser la méthode de numération globulaire plus rapide que le dosage de l'hémoglobine libérée au spectrophotomètre. Le maximum d'hémolyse est obtenu après 60 minutes à 37°C et reste constant comme l'ont montré Mayer, Croft et Gray (22) (tableau 2).

Précision de la méthode.

Le nombre d'hématies initiales par mm³ est déterminé par des lectures faites sur deux tubes contenant le mélange suspension d'hématies sensibilisées - eau physiologique. Le nombre d'hématies non hémolysées par mm³ est déterminé par des lectures faites sur les deux tubes contenant le mélange suspension d'hématies - sérum - eau physiologique. La différen-

Tableau N° 1

N° des sérum	Taux d'hémolyse par numération des hématies non hémolysées		Taux d'hémolyse par dosage de l'hémoglobine libérée, au spectrophotomètre	
	Taux	Nombre d'héma- ties hémolysées correspondant à ce taux	Taux	Nombre d'héma- ties hémolysées correspondant à ce taux
2	0,30	390.000	0,32	415.000
	0,65	396.000	0,71	430.000
	0,66	419.000	0,75	452.000
	0,70	425.000	0,77	464.000

3	0,85	715.000	0,79	670.000

4	0,33	44.000	0,33	45.000
	0,51	69.000	0,51	69.000
	0,60	81.000	0,63	88.000

Tableau N° 2

Temps en minutes	Nombre d'hématies hémolysées par mm ³
30	60.700
40	73.400
50	80.400
60	87.000
75	87.000
30	25.000
40	34.000
50	36.000
60	42.000
75	42.000

ce entre ces deux séries de lectures donne le nombre d'hématies hémolysées. Sur chaque tube, on effectue deux prises. Les lectures sont faites à l'hématimètre Thoma sur 16 carrés, représentant au total 64 carrés. Quand le nombre d'hématies par mm³ est supérieur à 40.000 les lectures sont effectuées après dilution au 1/100 ou au 1/200 si ce nombre dépasse 2.500.000. Le rapport $\frac{\text{hématies hémolysées}}{\text{hématies initiales}}$ donne le taux d'hémolyse.

Pour connaître l'erreur sur le taux d'hémolyse, j'ai calculé d'abord les erreurs réelles sur les nombres moyens d'hématies par carré d'hématimètre e_i et e_s (e_i = erreur sur les lectures des hématies initiales; e_s = erreur sur les lectures des hématies non hémolysées). Pour le taux d'hémolyse j'ai appliqué la formule employée par S.Filitti-Wurmser et Y.Jacquot-Armand (1) pour calculer l'erreur sur le taux d'agglutination:

$$T = 1 - \frac{n_s}{n_i} \pm \left[\frac{n_s}{n_i} \left(\frac{e_s}{n_s} + \frac{e_i}{n_i} \right) \right]$$

n_i et n_s représentent respectivement les nombres par carré d'hématimètre des hématies initiales et des hématies non hémolysées. Le terme entre parenthèses est l'erreur standard σ sur les taux d'hémolyse T (tableau 3).

Variation du taux d'hémolyse en fonction des concentrations d'hématies.

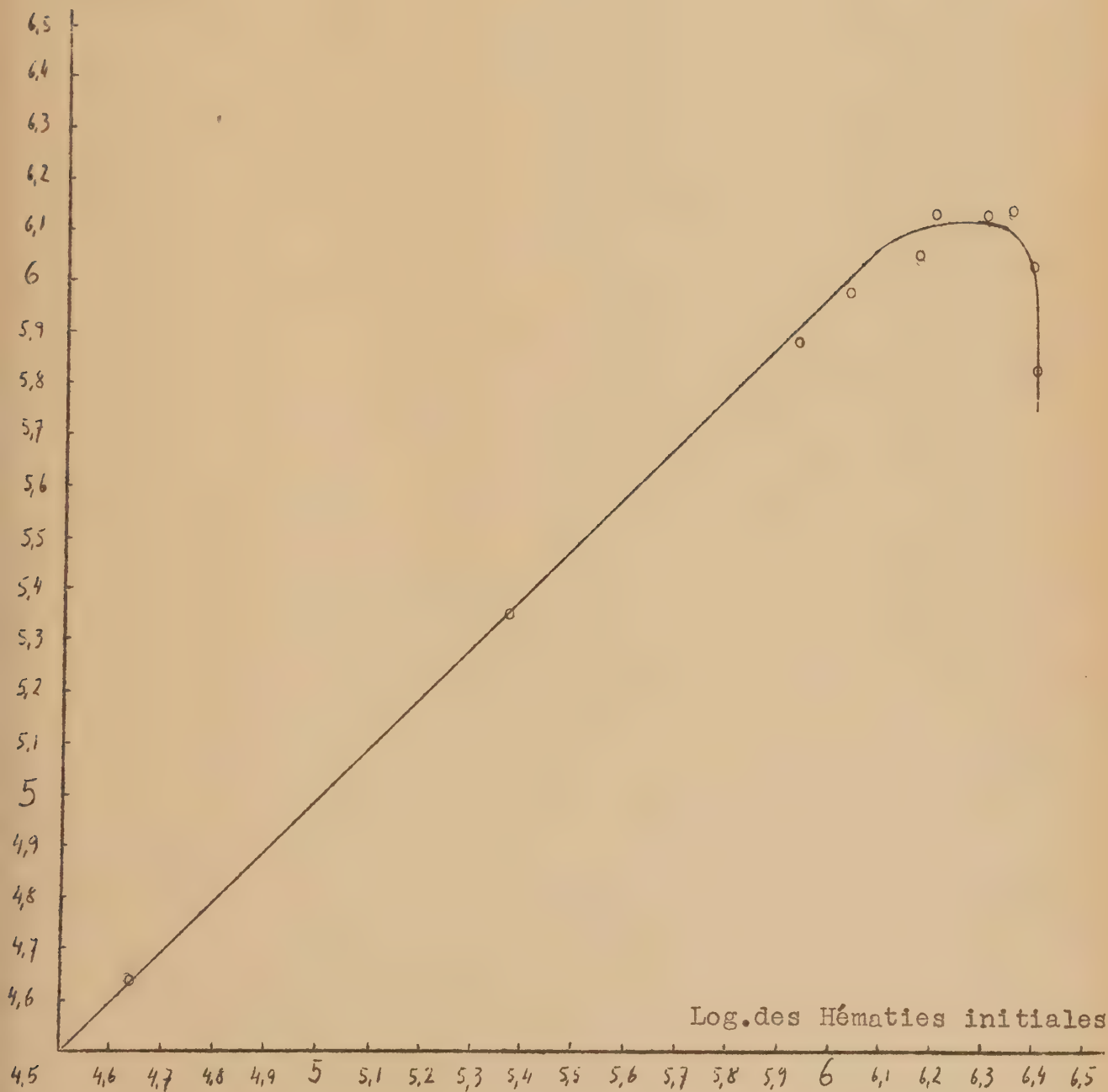
Le nombre d'hématies hémolysées augmente proportionnellement à la concentration d'hématies jusqu'à une valeur maxima qui est caractéristique de chaque sérum. Si on porte en abscisse le logarithme du nombre des hématies initiales et en ordonnée le logarithme du nombre des hématies hémolysées on obtient pour tous les sérums étudiés des courbes ayant la même allure que celle représentée sur la figure I.

Le nombre maximum d'hématies hémolysées (ou $N_{\text{max.}}$) donne le titre en complément d'un sérum; il est très sensiblement proportionnel à la concentration du sérum (tableau 4).

Tableau N° 3

T	σ	T	σ
0,14	0,05	0,50	0,02
0,16	0,05	0,51	0,015
0,18	0,02	0,53	0,03
0,21	0,04	0,55	0,015
0,22	0,04	0,56	0,025
0,27	0,04	0,56	0,06
0,28	0,03	0,57	0,03
0,31	0,02	0,58	0,025
0,32	0,02	0,61	0,025
0,34	0,03	0,65	0,015
0,38	0,04	0,65	0,05
0,39	0,05	0,69	0,025
0,40	0,02	0,69	0,05
0,46	0,04	0,70	0,02
0,48	0,02	0,75	0,025
0,49	0,02	0,76	0,025
0,49	0,03	0,80	0,03

Log. des
Hématies
hémolysées



Log. des Hématies initiales

Figure I

Tableau N° 4

N° des sérum	Dilution	N _{max}
6	0	1.300.000
	1/2	651.000
	1/4	317.000

8	1/4	2.170.000
	1/8	1.074.000

1	0	315.000
	1/2	142.000

5	1/2	1.100.000
	1/4	551.000

L'ensemble des résultats obtenus sur 20 sérums différents m'a amenée à représenter la marche de l'hémolyse au voisinage du maximum par la formule d'extrapolation suivante:

$$N_h = N_{\max} \left(\frac{\tau}{1-\tau} \right) n$$

où N_h représente la quantité d'hématies hémolysées correspondant au taux d'hémolyse τ , exprimé en fraction de 1 et où $N_{\max}$ est le nombre maximum d'hématies pouvant être hémolysées par le sérum.

N_h , $N_{\max}$ et τ sont des données expérimentales, permettant de calculer n correspondant à tous les taux d'hémolyse.

J'ai calculé les facteurs à appliquer pour calculer le nombre maximum d'hématies hémolysées par un sérum connaissant le nombre d'hématies hémolysées au taux τ (tableau 5). Par exemple, si un sérum hémolyse 322.000 hématies par mm^3 au taux 0,32, le nombre maximum d'hématies qu'il peut hémolyser sera $\frac{322.000}{0,7} = 460.000$. Dans le tableau 6 on trouvera quelques exemples pris sur cinq parmi les sérums étudiés.

Tableau N° 5

τ	n	$(\frac{\tau}{1-\tau})n$
0,25	1,75	0,583
0,30	1,62	0,693
0,35	1,45	0,780
0,40	1,29	0,859
0,45	1,14	0,932
0,50	0,98	0,98
0,55	0,83	1,013
0,60	0,65	1,005
0,65	0,63	0,980
0,70	0,38	0,885
0,75	0,25	0,750

Tableau N° 6

N° des sérum	N _h	τ	N _{max}
7	467.800 394.000	0,63 0,39	476.000 469.000) 472.500
9	2.263.000 1.588.000	0,33 0,20	3.000.000 3.370.000) 3.185.000
11	534.000 683.000 410.000	0,72 0,52 0,29	651.000 695.000 660.000) 668.000
12	461.000 354.000	0,46 0,30	495.000 513.000) 504.000
13	391.000 257.000	0,39 0,22	465.000 479.000) 472.000

DEUXIEME PARTIE

Chapitre I

L'isohémagglutination.

En 1947, S.Filitti-Wurmser et Y.Jacquot-Armand (1) publiaient les faits essentiels qui démontraient la réversibilité de l'isohémagglutination et dont voici un bref résumé.

1. Technique.

Il était tout d'abord nécessaire de disposer d'une méthode quantitative; celle qui a été employée par les auteurs consiste à faire deux numérations globulaires à l'hématimètre: celle des hématies ajoutées au sérum agglutinant et celle des hématies restées libres après agitation dans des conditions définies de l'agglutinat formé.

Les sérums employés étaient obtenus à partir du sang de donneurs A₁ et les hématies provenaient du sang de donneurs B, recueilli sur la solution anticoagulante de Wurmser.

Les mélanges sérum + suspension d'hématies sont maintenus à une température donnée; ils sont ensuite agités mécaniquement pour atteindre le point final de l'agglutination. La durée de l'agitation varie avec la température: elle est d'une demi-heure à 37°C, d'une heure à 25°C et de deux heures à 4°C.

2. Variation du taux d'agglutination en fonction des concentrations de sérum et d'hématies à une température donnée.

Le nombre des hématies agglutinées augmente en fonction du nombre d'hématies initiales, d'abord d'une manière

strictement proportionnelle; ensuite il ne suit plus une loi linéaire et finit par atteindre une valeur constante. Le nombre maximum d'hématies agglutinées à une température donnée est très sensiblement proportionnel à la concentration du sérum.

3. Réversibilité après dilution à température constante.

On obtient le même taux d'agglutination pour des concentrations données d'hématies et de sérum quand on met d'emblée en présence hématies et sérum et quand on dissocie par dilution l'agglutinat préalablement formé à des concentrations plus élevées.

4. Influence de la température sur le taux d'agglutination.

Le taux d'agglutination est toujours plus élevé à 4°C qu'à 37°C et il reprend sa valeur initiale quand le mélange (agglutinat + agglutinine + hématies) est porté à nouveau à 37°C.

5. Etude de l'agglutinine fixée à 37°C dans un agglutinat.

La dissociation d'un agglutinat libère en même temps que des hématies de l'agglutinine; le taux d'agglutination obtenu en faisant agir sur des hématies de l'agglutinine élue à 37°C (à partir d'un agglutinat formé à 37°C) varie en fonction de la température comme dans le sérum initial.

L'ensemble de ce travail montrait donc que l'isohémagglutination est une réaction réversible, qui suit des lois quantitatives. L'équilibre entre l'agglutinat, les hématies libres et l'isoagglutinine β est déplacé avec la température dans le sens correspondant à une réaction exothermique. Le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C par un sérum mesure sa teneur en agglutinine.

Poursuivant leur travail, les auteurs précédents et R. Wurmser (5) remarquèrent qu'en maintenant du sérum humain

pendant 30 ou 50 minutes à 56°C les nombres maxima N_{37} et N_{25} d'hématies qu'il peut agglutiner à 37°C ou à 25°C sont généralement augmentés. Par contre, le nombre maximum N_4 d'hématies qu'il peut agglutiner à 4°C n'est jamais modifié. Le chauffage détruit un inhibiteur présent en quantité variable dans le sérum, qui se manifeste surtout à 37°C, puis de moins en moins quand la température s'abaisse, jusqu'à être sans influence à 4°C. Le rapport N_4/N_{37} du nombre maximum des hématies agglutinées à 4°C et à 37°C qui varie de 3 à 6,5 pour les sérums frais passe, après chauffage du sérum 50 minutes à 56°C, à 2,5 pour les sérums du sous-groupe A_1O et 1,4 pour les sérums du sous-groupe A_1A .

Chapitre II

Etude de l'inhibiteur de l'isohémagglutination.

Matériel biologique.

J'ai utilisé des sérums provenant de sang prélevé stérilement sur des donneurs du groupe A_1 et mis à coaguler à 4°C. Le sang est centrifugé à 4°C et le sérum recueilli est conservé gelé.

Les hématies proviennent de donneurs appartenant au groupe B. Le sang est recueilli sur la solution citratée de Wurmser et utilisé pendant 4 à 6 jours. Au moment de l'emploi, Il est prélevé stérilement à la seringue à travers le bouchon en caoutchouc de la bouteille. On centrifuge pour enlever le plasma, et on lave deux fois par centrifugation avec un tampon physiologique. La masse des hématies est ramenée au volume initial avec ce même tampon physiologique.

Les hématies de mouton sont recueillies stérilement

sur solution de Wurmser ou défibrinées par agitation avec des billes de verre. Elles ne sont pas employées pendant plus de cinq jours.

Influence du sérum AB sur le taux d'agglutination des sérums β .

Pour être certaine que l'inhibiteur de l'agglutination était bien contenu dans tous les sérums humains frais et qu'il était indépendant de l'agglutinine, j'ai étudié l'influence exercée par des sérums d'individus appartenant au groupe AB sur l'agglutination d'hématies B par des sérums β .

Ces sérums ne renferment ni agglutinine α ni agglutinine β . Si on dilue un sérum β chauffé 50 minutes à 56°C avec du sérum AB frais et que l'on observe une inhibition de l'agglutination, ce sera bien la preuve que l'inhibiteur est indépendant de l'agglutinine.

J'ai déterminé le nombre maximum d'hématies agglutinées à 37°C (N_{37}) par un sérum β frais dilué 1/2 par du tampon physiologique, ou dilué 1/2 après chauffage 50 minutes à 56°C par du sérum AB, frais ou chauffé 50 minutes à 56°C.

Le sérum AB chauffé 50 minutes à 56°C est sans action sur le nombre maximum d'hématies agglutinées à 37°C par du sérum β chauffé; mais le sérum AB non chauffé abaisse le N_{37} du sérum β chauffé à une valeur sensiblement égale à celle obtenue avec le sérum frais dilué par du tampon physiologique (tableau 7). Il est donc certain que tous les sérums frais contiennent l'inhibiteur de l'agglutination et que ce dernier est totalement indépendant de l'agglutinine.

Titrage du complément dans les sérums β avant et après l'agglutination des hématies B.

Si le complément est bien l'inhibiteur de l'isohémagglutination, on peut se demander s'il est possible de déceler une baisse du titre en complément du sérum après l'agglutination des hématies. Pour cette étude, j'ai séparé par centrifuga-

Tableau N° 7

N° des sérum	N ₃₇		
	Sérum frais dilué 1/2 par une sol. tampon	Sérum chauffé dilué 1/2 par du sérum AB chauffé ou par une solution tampon	Sérum chauffé dilué 1/2 par du sérum AB frais
11	770.000	1.275.000	770.000
6	250.000	370.000	280.000
12	440.000	620.000	440.000

tion le sérum de l'agglutinat et j'ai titré le complément qui y était contenu, en le comparant avec du sérum frais. Le volume de sérum à employer, après séparation de l'agglutinat, a été déterminé en tenant compte de la dilution introduite par la suspension d'hématies et calculée sachant que le volume moyen d'une hématie est $9 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$.

On remarquera (tableau 8) que les deux sérums chez lesquels on observe une baisse du titre en complément après agglutination sont les deux montrant l'inhibition la plus manifeste (le N_{37} après chauffage augmente de 1.000.000 pour le sérum N° 10 et de 540.000 pour le sérum N° 3). Pour le sérum N° 5, où le N_{37} augmente après chauffage de 250.000, aucune baisse du titre en complément n'a pu être mise en évidence. Malheureusement, il est rare de trouver des sérums où l'inhibition soit de l'ordre de 500.000 hématies; c'est pourquoi j'ai recherché s'il existait un autre moyen de mettre en évidence une action possible du complément. Si ce dernier ne se fixe qu'en très petite quantité sur les hématies B, c'est peut-être parce qu'il entre en compétition avec l'agglutinine. Si le sérum est mis en présence d'hématies A_1 , le complément n'étant plus gêné par l'agglutinine pourra se fixer plus nettement.

Influence de l'adsorption du sérum β sur les hématies A_1 .

a. Influence sur le rapport $\frac{N_4}{N_{37}}$ des sérums β .

Si les hématies A_1 fixent le complément, elles doivent avoir une influence sur le taux d'agglutination à 37°C du sérum. Après mise en contact des hématies A_1 et du sérum β , ce dernier doit avoir un rapport $\frac{N_4}{N_{37}}$ semblable à celui obtenu avec le sérum chauffé 50 minutes à 56°C .

Des sérums β sont mis en présence de suspensions d'hématies A_1 (6.000.000 - 7.500.000 hématies par mm^3) préalablement lavées trois fois par centrifugation avec de l'eau physiologique. Ce mélange est agité 50 minutes à 37°C . Après centrifugation à 37°C , le sérum séparé des hématies est titré en

Tableau N° 8

N° des sérum	N ₃₇		τ (agglu- tina- tion)	N _{max}	
	sérum frais	sérum chauffé 50 min. à 56°C.		sérum frais	sérum chauffé 50 min. à 56°C. <i>après agglutination</i>
10	2.000.000	3.000.000	0,90	2.263.000	2.100.000
3	1.130.000	1.700.000	0,58	2.450.000	2.225.000
5	530.000	760.000	0,40	1.040.000	1.040.000

fonction du nombre d'hématies par mm^3 à 37°C et à 4°C . Le rapport N_4/N_{37} devient le même que celui des sérums chauffés à 56°C .

Un autre qui, par vieillissement à l'état liquide, était entièrement dépourvu de complément a donné le même chiffre (1,9) pour le rapport N_4/N_{37} avec le sérum frais, le sérum chauffé et le sérum après adsorption par les hématies A_1 .

En mettant en contact à 4°C trois sérums A_1 et les hématies A_1 lavées et en agitant pendant trois heures, on trouve que le rapport N_4/N_{37} reste le même que dans les sérums frais (tableau 9).

Donc, l'adsorption du sérum sur les hématies A_1 exerce la même influence sur le rapport N_4/N_{37} que le chauffage à 56°C pendant 50 minutes.

b. Titration du complément dans les sérums β .

Le complément est titré dans le sérum frais et dans le sérum après adsorption sur les hématies A_1 . L'adsorption à 37°C provoque une baisse très sensible du pouvoir hémolytique, tandis qu'à 4°C elle est sans action sur le titre en complément (tableau 10).

Ces expériences de fixation du complément par les hématies A_1 sont donc tout à fait en faveur de l'identification de l'inhibiteur de l'isohémagglutination avec le complément.

Tableau N° 9

N° des sérum	N ₄ /N ₃₇			
	sérum frais	sérum chauffé 50 min. à 56°C.	sérum après adsorption sur les hématies A ₁	
			à 37°C	à 4°C
6	3,4	2,3	2,1	3,3
12	3,00	2,2	2,1	2,7
14	5,2	2,7	3	5
8	3,77	2,51	2,8	-

Tableau N° 10

N° des sérum	N _{max}		
	sérum frais	sérum après adsorption sur les hématies A ₁	
		à 37°C	à 4°C
7	446.000	300.000	469.000
12	480.000	340.000	440.000
14	1.980.000	1.550.000	1.980.000
6	1.300.000	85.000	-
8	2.244.000	1.480.000	-
11	990.000	670.000	-

TROISIEME PARTIE

Chapitre I

L'Immunhémagglutination.

Préparation des immunsérums.

Les lapins reçoivent cinq injections intra-veineuses ou intra-péritonéales effectuées tous les cinq jours de 1 cm^3 d'une suspension ou à $1/10$ dans du sérum physiologique d'hématies B, lavées auparavant trois fois avec du sérum physiologique. On laisse huit jours de repos après la dernière injection et le sang est prélevé stérilement par ponction veineuse ou cardiaque. Le sang est mis immédiatement à 4°C et centrifugé, après quelques heures de repos, à 4°C . Le sérum ainsi obtenu renferme, à côté des agglutinines spécifiques anti-B, des agglutinines anti-hématies humaines non spécifiques, des agglutinines anti-M et anti-N et des hémolysines. Ces agglutinines et hémolysines sont éliminées en mettant en contact le sérum avec un volume égal de suspension d'hématies A_1O MN, préalablement lavées trois fois avec du sérum physiologique et contenant environ 7.000.000 d'hématies par mm^3 . On agite le mélange pendant trois heures à 4°C , on centrifuge à cette même température et le sérum surnageant est additionné une deuxième fois d'hématies A_1O MN. Le mélange est agité pendant une heure à 37°C . Après centrifugation, on fait une deuxième adsorption à 37°C . Le sérum ainsi obtenu ne renferme généralement plus que les agglutinines anti-B. S'il contient encore des agglutinines non spécifiques, on recommencera l'adsorption jusqu'à ce que le sérum n'agglutine plus ~~que~~ les hématies A_1 . Il est ensuite addi-

tionné de sérum de lapin frais qui lui apporte du complément, ce dernier ayant été fixé par les hématies pendant les diverses adsorptions. Le mélange est réparti en ampoules, gelé à -20°C et conservé gelé pendant toute la durée du travail.

Technique.

La technique employée est celle de S.Filitti-Wurmser et Y.Jacquot-Armand (8). Pour mesurer le taux d'agglutination ($\frac{\text{hématies agglutinées}}{\text{hématies initiales}}$) on fait deux numérations globulaires à l'hématimètre: l'une, des hématies ajoutées au sérum agglutinant, l'autre, des hématies restées libres après agglutination.

- a. Conditions de l'agglutination. Pour chaque expérience, on utilise quatre ampoules. Dans les deux premières, on met le mélange suspension d'hématies + solution tampon; dans les deux autres, on met le mélange suspension d'hématies + sérum. Les ampoules sont scellées; celles contenant le mélange suspension d'hématies + sérum sont agitées mécaniquement à une température constante; l'agitation a pour but d'accélérer l'agglutination et de lui permettre d'atteindre l'état d'équilibre. La durée de l'agitation varie avec la température: elle est de deux heures à 4°C et de 30 minutes à 37°C . Les agitateurs employés ont des vitesses réglables; ils portent un plateau horizontal sur lequel les ampoules sont fixées.
- b. Précision de la méthode. On fait dans chaque ampoule deux prélèvements que l'on dépose sur l'hématimètre Thoma. Pour chaque groupe de deux ampoules les quatre lectures correspondent à 64 carrés de l'hématimètre.

Pour connaître l'erreur sur le taux d'agglutination, j'ai calculé d'abord les erreurs réelles sur les nombres moyens d'hématies par carré d'hématimètre e_1 et e_s (e_1 , erreur sur les lectures des hématies initiales et e_s , erreur sur les lectures des hématies libres après l'agglutination). Puis j'ai appliqué la formule suivante (1):

$$T = 1 - \frac{n_s}{n_i} \pm \left[\frac{n_s}{n_i} \left(\frac{c_s}{n_s} + \frac{c_i}{n_i} \right) \right]$$

n_i et n_s représentent respectivement les nombres par carré d'hématimètre des hématies initiales et des hématies non agglutinées. Le terme entre parenthèses est l'erreur standard s sur le taux d'agglutination (tableau 11).

Variation du taux d'agglutination en fonction des concentrations d'hématies.

Le nombre d'hématies agglutinées en fonction du nombre d'hématies initiales augmente d'abord d'une façon strictement linéaire, puis finit par atteindre une valeur constante. Si on porte en abscisses les logarithmes du nombre des hématies initiales par mm^3 et en ordonnées les logarithmes du nombre des hématies agglutinées par mm^3 , on voit que la pente de la première portion est une droite et qu'ensuite on obtient une portion horizontale qui correspond au nombre maximum d'hématies agglutinées.

Dans le tableau 12, on trouvera les chiffres obtenus sur deux sérums. Le taux d'agglutination a été déterminé après une demi-heure d'agitation à 37°C , le sérum ayant été au préalable chauffé 50 minutes à 56°C .

Le nombre maximum d'hématies agglutinées est proportionnel à la dilution du sérum comme on peut le voir dans le tableau 13.

Pour les 11 sérums étudiés, des résultats comparables ont été obtenus. L'erreur sur le nombre maximum à 37°C est de $\pm 9,7$ pour cent.

Influence de la température sur le taux d'agglutination.

Pour un même nombre d'hématies initiales, le taux d'agglutination à 4°C est toujours plus élevé qu'à 37°C . Le nombre d'hématies agglutinées augmente toujours en fonction du

the fact that the number of persons in the family is not the same in all cases. It is not the same in all cases.

the fact that the number of persons in the family is not the same in all cases. It is not the same in all cases.

the fact that the number of persons in the family is not the same in all cases. It is not the same in all cases.

Tableau N° 11

T	σ
0,20	0,05
0,38	0,03
0,42	0,03
0,43	0,03
0,44	0,03
0,51	0,02
0,53	0,02
0,63	0,02
0,70	0,015

Tableau N° 12

A un volume constant de sérum (0,4 cm³), on ajoute un volume constant (0,2 cm³) de suspensions d'hématies de concentrations croissantes.

Sérum N° 1 (dilué 1/2)		Sérum N° II (dilué 1/5)	
Hématies initiales par mm ³	Hématies agglutinées par mm ³ à 37°C	Hématies initiales par mm ³	Hématies agglutinées par mm ³ à 37°C.
370.000	359.000	380.000	343.000
521.000	377.000	445.000	429.000
530.000	394.000	479.000	457.000
532.000	450.000	547.000	470.000
600.000	425.000	608.000	560.000
668.000	540.000	800.000	772.000
768.000	510.000	1.340.000	763.000
985.000	786.000	1.360.000	800.000
1.650.000	859.000	2.150.000	805.000
2.393.000	1.195.000	2.593.000	811.000
3.280.000	1.061.000	2.939.000	851.000
4.176.000	1.035.000		

Tableau N° 13

N° des sérum	Dilution	Nombre maximum d'hématies agglutinées par mm ³ à 37°C
I	1/5	450.000
	1/4	510.000
- - - - -		
III	1/6	985.000
	1/4	1.400.000
- - - - -		
V	1/8	475.000
	1/4	875.000
- - - - -		
VI	1/20	325.000
	1/18	418.000

nombre des hématies initiales, puis atteint une valeur constante; mais le nombre maximum d'hématies agglutinées est toujours plus élevé à 4°C qu'à 37°C. L'erreur sur le nombre maximum à 4°C est de ± 8 pour cent (tableau 14).

Le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C ou N_4 peut être considéré comme représentant, en valeur relative, la quantité d'agglutinine contenue dans le sérum. Ce nombre maximum est proportionnel à la concentration du sérum dans le mélange sérum + suspension d'hématies (tableau 15).

Influence du chauffage à 56°C pendant 50 minutes sur l'agglutination.

Le chauffage à 56°C pendant 50 minutes des immunosérums anti-B est sans action sur le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C, mais il augmente le nombre maximum d'hématies agglutinées à 37°C. Le rapport :

$$\frac{\text{nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C (N}_4\text{)}}{\text{nombre maximum d'hématies agglutinées à 37°C (N}_{37}\text{)}}$$

qui varie de 1,9 à 12 pour le sérum frais s'abaisse à 1,17 en moyenne pour le sérum chauffé (tableau 16). Le calcul du rapport de la différence moyenne à l'erreur standard (3,48 pour 10 degrés de liberté) montre que l'effet de la température observé est pleinement significatif. On remarquera que dans ces mesures destinées à comparer les valeurs de N à 4°C et à 37°C les parts d'erreur dues à la dilution ne s'additionnent pas parce que les deux séries d'expériences sont faites à une même dilution. Il existe donc bien un inhibiteur thermolabile dont l'action est manifeste à 37°C et non à 4°C.

Réversibilité de l'agglutination après dilution à température constante.

a. Réversibilité après dilution à 37°C.

On obtient le même taux d'agglutination pour des concentrations données d'hématies et de sérum quand on met en présence hématies et sérum, ou quand on dissocie par dilution

Tableau N° 14

A un volume constant de sérum (0,4 cm³), on ajoute un volume constant (0,2 cm³) de suspensions d'hématies de concentrations croissantes.

Sérum N° I (dilué 1/2)		Sérum N° II (dilué 1/5)	
Hématies initiales par mm ³	Hématies agglutinées par mm ³ à 4°C	Hématies initiales par mm ³	Hématies agglutinées par mm ³ à 4°C
402.000	375.000	376.000	365.000
429.000	425.000	537.000	470.000
490.000	478.000	546.000	524.000
521.000	500.000	1.085.000	773.000
985.000	700.000	2.060.000	900.000
2.395.000	1.305.000	2.593.000	865.000
3.820.000	1.345.000	2.939.000	860.000
4.176.000	1.200.000	2.980.000	872.000

Tableau N° 15

N° des sérum	Dilution	Nombre maximum d'hématies agglutinées par mm ³ à 4°C
II	1/8	570.000
	1/6	700.000

V	1/8	575.000
	1/6	755.000
	1/4	1.102.000

VII	1/6	460.000
	1/4	720.000
	1/2	1.161.000

VIII	1/8	335.000
	1/4	630.000

Tableau N° 16

N° des sérum	Sérum frais			Sérum chauffé		
	N ₃₇	N ₄	N ₄ /N ₃₇	N ₃₇	N ₄	N ₄ /N ₃₇
IV	404.000	5.180.000	12	4.940.000	5.180.000	1,05
V	2.300.000	4.500.000	1,9	3.600.000	4.500.000	1,25
VII	1.208.000	2.996.000	2,47	2.604.000	2.996.000	1,15
VIII	2.157.000	7.820.000	3,6	5.753.000	7.820.000	1,34
IX	1.004.000	7.055.000	7	5.770.000	7.055.000	1,22
I	-	-	-	2.080.000	2.385.000	1,13
II	u	--	-	4.142.000	4.380.000	1,05
III	-	-	-	2.445.000	2.600.000	1,05
VI	-	-	-	7.000.000	8.350.000	1,19
X	-	-	-	6.000.000	7.120.000	1,18
XI	-	-	-	301.000	404.000	1,34

l'agglutinat préalablement formé à des concentrations plus élevées.

On opère une première agglutination dans un petit volume v , puis par dilution on amène au volume V . On compare avec deux agglutinations : la première dans le volume v , la deuxième dans le volume V (tableaux 17 et 18).

On voit que dans le tube 5 qui est lu immédiatement après la dilution le nombre des hématies libres correspond à celui des tubes 1 et 2 (compte tenu de la dilution); dans les tubes 6 et 7 le nombre des hématies libres est le même que dans les tubes 3 et 4.

Le tableau 19 résume les résultats obtenus sur trois sérums, en faisant varier les dilutions.

b. Réversibilité après dilution à 4°C.

On opère une première agglutination dans un volume v à 4°C, puis par dilution on amène au volume V . On compare avec deux agglutinations: la première dans le volume v ; la deuxième dans le volume V .

On voit que dans ces conditions la réversibilité n'a pu être mise en évidence, par suite sans doute de la lenteur de la réaction (tableaux 20, 21 et 22).

Réversibilité par dilution et élévation de température simultanées.

Le même taux d'agglutination est obtenu soit que l'on mette en présence hématies et sérum à 37°C, soit que l'on dissocie par dilution à 37°C un agglutinat préalablement formé à des concentrations plus élevées à 4°C, ce qui démontre que la non-réversibilité de l'agglutination par dilution à 4°C est bien due à la lenteur de la réaction.

On opère une première agglutination dans un petit volume v à 4°C; puis par dilution à 4°C et à 37°C on l'amène au volume V . On compare avec trois agglutinations: la première dans

Tableau N° 17

0,4 cm³ d'une suspension de 720.000 hématies par mm³ et 0,4 cm³ de sérum sont versés dans une série de 7 tubes.

Les tubes 1 et 2 correspondent au volume v; les tubes 3 et 4 au volume V; dans les tubes 5, 6 et 7, l'agglutination est effectuée dans le volume v et on amène par dilution 1/5 au volume V.

Dans les tubes 3 et 4, on ajoute 3,2 cm³ de solution tampon à 37°C. Les sept tubes sont maintenus 1/4 d'heure à 37°C, puis agités 40 minutes à 37°C. Au bout de ce temps on ajoute 3,2 cm³ de solution tampon à 37°C dans les tubes 5, 6 et 7. L'agglutination dans le tube 5 est lue immédiatement; les tubes 6 et 7 sont agités pendant 40 minutes.

N° des tubes	1 et 2	3 et 4	5	6 et 7
Hématies libres par mm ³	16.200	15.000	4.000	14.000
Taux d' aggluti- nation	0,95	0,79	0,98	0,80
Durée de l'agita- tion (en min.)	40	40	-	40

Tableau N° 18

0,4 cm³ d'une suspension de 534.000 hématies par mm³ et 0,4 cm³ de sérum sont versés dans une série de sept tubes.

Les tubes 1 et 2 correspondent au volume v; les tubes 3 et 4 au volume V; dans les tubes 5, 6 et 7, l'agglutination est effectuée dans le volume v et on amène par dilution 1/8 au volume V.

Dans les tubes 3 et 4, on ajoute 5,6 cm³ de solution tampon. Les sept tubes sont maintenus un quart d'heure à 37°C, puis agités 50 minutes à 37°C. Au bout de ce temps, on ajoute 5,6 cm³ de solution tampon à 37°C dans les tubes 5, 6 et 7. L'agglutination dans le tube 5 est lue immédiatement. Les tubes 6 et 7 sont agités pendant 50 minutes.

N° des tubes	1 et 2	3 et 4	5	6 et 7
Hématies libres par mm ³	41.000	8.800	5.290	7.900
Taux d' aggluti- nation	0,85	0,74	0,84	0,76
Durée de l'agita- tion (en min.)	50	50	-	50

Tableau N° 19

1. Taux d'agglutination du mélange (sérum + suspension d'hématies) dans le volume v , à 37°C .
2. Taux d'agglutination de ce mélange dans le volume V , à 37°C .
3. v/V .
4. Taux d'agglutination du mélange après dilution à 37°C .

Numéros des sérum	1	2	3	4
II	0,95	0,79	1/5	0,80
I	0,80	0,60	1/5	0,56
I	0,85	0,74	1/8	0,76
I	0,80	0,63	1/8	0,67
VII	0,92	0,66	1/8	0,67
II	0,97	0,75	1/8	0,78
I	0,75	0,68	1/10	0,67

Tableau N° 20

0,4 cm³ d'une suspension d'hématies à 448.000 hématies par mm³ et 0,4 cm³ de sérum sont versés dans une série de sept tubes.

Les tubes 1 et 2 correspondent au volume v; les tubes 3 et 4 au volume V; dans les tubes 5, 6 et 7 l'agglutination est effectuée dans le volume v et on amène par dilution 1/8 au volume V.

Dans les tubes 3 et 4 on ajoute 5,6 cm³ de solution tampon. Les sept tubes sont maintenus une demi-heure à 4°C, puis agités 120 minutes à 4°C. Au bout de ce temps, on ajoute 5,6 cm³ de solution tampon à 4°C dans les tubes 5, 6 et 7. L'agglutination dans le tube 5 est lue après 15 minutes de repos; les tubes 6 et 7 sont agités pendant 120 minutes.

N° des tubes	1 et 2	3 et 4	5	6 et 7
Hématies libres par mm ³	18.000	8.000	3.850	3.600
Taux d' aggluti- nation	0,91	0,70	0,86	0,87
Durée de l'agita- tion (en min.)	120	120	-	120

Tableau N° 21

0,4 cm³ d'une suspension d'hématies à 1.154.000 hématies par mm³ et 0,4 cm³ de sérum sont versés dans une série de sept tubes.

Les tubes 1 et 2 correspondent au volume v; les tubes 3 et 4 au volume V; dans les tubes 5, 6 et 7, l'agglutination est effectuée dans le volume v et on amène par dilution 1/20 au volume V.

Dans les tubes 3 et 4 on ajoute 15,2 cm³ de solution tampon. Les sept tubes sont maintenus une demi-heure à 4°C, puis agités 120 minutes à 4°C. Au bout de ce temps, on ajoute 15,2 cm³ de solution tampon à 4°C dans les tubes 5, 6 et 7. L'agglutination dans le tube 5 est lue après 15 minutes de repos; les tubes 6 et 7 sont agités pendant 120 minutes.

N° des tubes	1 et 2	3 et 4	5	6 et 7
Hématies libres par mm ³	222.000	18.000	11.000	11.500
Taux d' aggluti- nation	0,61	0,36	0,60	0,60
Durée de l'agita- tion (en min.)	120	120	-	120

Tableau N° 22

1. Taux d'agglutination du mélange (sérum + suspension d'hématies) dans le volume v à 4°C .
2. Taux d'agglutination de ce mélange dans le volume V à 4°C .
3. v/V .
4. Taux d'agglutination du mélange après dilution à 4°C .

Numéros des sérum	1	2	3	4
II	0,88	0,66	1/3	0,80
X	0,58	0,26	1/3	0,56
X	0,39	0,18	1/3	0,35
I	0,69	0,40	1/5	0,59
II	0,49	0,30	1/5	0,50
I	0,98	0,88	1/8	0,98
I	0,97	0,82	1/8	0,95
II	0,96	0,75	1/8	0,92
VII	0,91	0,70	1/8	0,87
II	0,98	0,74	1/8	0,94
II	0,85	0,44	1/10	0,80
II	0,70	0,28	1/10	0,71
I	0,61	0,36	1/20	0,60

le volume v à 4°C , la deuxième dans le volume V à 4°C , la troisième dans le volume V à 37°C .

On voit que dans les tubes 6 et 7, où la dilution est faite à 4°C , la réversibilité n'est que très partielle; par contre, dans les tubes 10 et 11, où la dilution est faite à 37°C , le nombre des hématies libres est le même que dans les tubes 8 et 9, où l'agglutination est faite entièrement à 37°C (tableaux 23 et 24).

Etude de l'agglutinine fixée à 37°C dans un agglutinat.

Pour rechercher s'il y a une ou plusieurs agglutinines β dans les immunsérums capables d'agir à des températures différentes, j'ai étudié le comportement de l'agglutinine fixée à 37°C dans un agglutinat. L'agglutinine est élue à 37°C , en agitant l'agglutinat et les hématies, séparées du sérum par centrifugation, avec un tampon physiologique.

J'ai mis en présence dans des tubes à centrifuger fermés $0,2\text{ cm}^3$ d'une suspension d'hématies avec $0,4\text{ cm}^3$ du sérum. Le mélange est laissé un quart d'heure à 37°C , puis agité une demi-heure à cette même température. Le tube est centrifugé à 37°C ; le culot (hématies agglutinées + hématies libres) est lavé avec du tampon physiologique à 37°C . Le culot est remis en suspension dans du tampon à 37°C (même volume que le volume initial sérum + suspension d'hématies ou 3 ou 5 fois ce volume) puis agité de nouveau 30 minutes à 37°C . Le tube est ensuite centrifugé à 37°C .

On titre l'agglutinine contenue dans le liquide d'élution, à 4°C et à 37°C . On voit que la dissociation de l'agglutinat libère de l'agglutinine et que le rapport du nombre maximum d'hématies agglutinées par le liquide d'élution à 4°C et à 37°C est sensiblement le même que le rapport N_4/N_{37} du sérum (tableau 25).

Etude de l'agglutinine fixée à 4°C dans un agglutinat.

La même expérience a été refaite, mais en dissociant

Tableau N° 24

1. Taux d'agglutination du mélange (sérum + suspension d'hématies) dans le volume v à 4°C .
2. Taux d'agglutination de ce mélange dans le volume V à 4°C .
3. Taux d'agglutination de ce mélange dans le volume V à 37°C .
4. v/V .
5. Taux d'agglutination du mélange après dilution à 4°C .
6. Taux d'agglutination du mélange après dilution à 37°C .

Numéros des tubes serums	1	2	3	4	5	6
X	0,39	0,18	0,19	1/3	0,35	0,25
I	0,69	0,40	0,39	1/5	0,59	0,35
II	0,49	0,30	0,36	1/5	0,50	0,33
II	0,95	0,81	0,79	1/8	0,91	0,78
II	0,88	0,66	-	1/3	0,80	0,71
I	0,97	0,83	-	1/8	0,95	0,87
II	0,98	0,74	-	1/8	0,94	0,88
II	0,85	0,44	-	1/10	0,80	0,63
II	0,70	0,28	-	1/10	0,71	0,40
I	0,62	0,36	-	1/20	0,60	0,50

Tableau N° 25

N° des Sérums	N ₄ /N ₃₇	Hématies Aggluti- nées à 37°C	Taux d' aggluti- nation	Dilut.	Agglutination par le liquide d'élution		
					N ₃₇	N ₄	N ₄ /N ₃₇
I	1,13	236.000	0,94	1/5	39.000	42.000	1,06
		283.000	0,70	1/5	57.000	52.000	
		573.000	0,52	1/3	63.000	74.000	
II	1,05	343.000	0,90	1/3	23.000	20.500	1,04
		762.000	0,88	1/3	36.000	36.000	
		800.000	0,88	1/3	47.000	55.000	
VI	1,19	1.140.000	0,76	0	62.000	80.000	1,11
		938.000	0,69	0	76.000	73.000	
X	1,18	312.000	0,33	0	54.000	58.000	1
		400.000	0,46	1/3	44.000	40.000	

à 37°C un agglutinat formé à 4°C. L'agglutinine libérée est titrée à 4°C et à 37°C; le rapport N_4/N_{37} obtenu est le même que pour le sérum (tableau 26).

Ces résultats sont en faveur de l'existence d'une seule agglutinine.

De l'ensemble des résultats obtenus dans l'étude des immunsérums anti-B, on peut tirer les conclusions suivantes:

L'immunhémagglutination est une réaction réversible, qui suit des lois quantitatives.

C'est une réaction très probablement exothermique.

Le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C représente la teneur en agglutinine d'un sérum.

Enfin, il est probable que l'immunsérum ne renferme qu'une seule agglutinine β .

Chapitre II

Etude de l'inhibiteur de l'immunhémagglutination.

Titrage du complément dans les immunsérums anti-B avant et après l'agglutination des hématies B.

Le sérum est séparé de l'agglutinat par centrifugation et le complément est titré comparativement dans le sérum frais et dans le sérum après agglutination (tableau 27). On observe une baisse très sensible du titre en complément dans ce dernier cas.

Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus sur les sérums β , où la baisse du titre en complément n'était que très peu sensible. Il me semble cependant possible de donner une explication logique de ces faits. Comme on peut

Tableau N° 26

N° des sérum	N ₄ /N ₃₇	Hématies aggluti- nées à 4°C	Taux d' aggluti- nation	Dilut.	Agglutination par le liquide d'élution		
					N ₃₇	N ₄	N ₄ /N ₃₇
VI	1,19	988.000	0,66	0	46.000	47.000	1,13
		1.051.000	0,62	1/5	52.000	64.000	
X	1,18	396.000	0,61	1/3	24.000	34.000	1,12
		300.000	0,61	1/5	54.000	64.000	

Tableau N° 27

Numéros des sérum	N max	
	sérum frais	sérum après agglutination
IV	35.000	3.000
VIII	855.000	510.000
IX	36.000	7.500

le voir dans le tableau 28, le titre en complément des immun-sérums de lapin est beaucoup plus faible que celui des sérums humains. Par contre, leur teneur en agglutinine est nettement plus élevée. Si la quantité de complément fixé dans l'agglutination par les hématies est la même dans les deux cas, elle sera appréciable dans le cas des immun-sérums, mais non dans celui des sérums β . Une différence de 30.000 hématies, comme celle obtenue avec les immun-sérums N° IV et IX ne serait pas décelable dans les sérums humains.

J'ai étudié un sérum de lapin (tableau 29) que j'ai amené par addition de sérum de lapin frais en quantité suffisante à un titre en complément comparable à celui des sérums humains. Dans ce cas, la différence observée dans le titre avant et après l'agglutination des hématies B est du même ordre que celle observée dans les sérums β N° 3 et 10.

Influence de l'adsorption du sérum sur les hématies A_1 .

a. Influence sur le rapport $\frac{N_4}{N_{37}}$.

Les immun-sérums sont mis en présence de suspensions d'hématies A_1 (6.000.000 - 7.500.000 hématies par mm^3), préalablement lavées trois fois par centrifugation avec un tampon physiologique. Le mélange est agité 50 minutes à 37°C . Le sérum séparé des hématies par centrifugation est titré à 37°C et à 4°C . Le rapport $\frac{N_4}{N_{37}}$ devient le même que celui obtenu avec les mêmes sérums chauffés 50 minutes à 56°C .

b. Titration du complément.

Le complément est titré dans le sérum frais et dans le sérum séparé des hématies A_1 par centrifugation. L'adsorption provoque une baisse très nette du pouvoir hémolytique du sérum (tableau 30).

On peut donc admettre que l'inhibiteur de l'immunhém-agglutination est bien le complément.

Tableau N° 28

Numéros des sérum	N ₃₇		N max
	sérum frais	sérum chauffé	
Humains			
2	470.000	-	2.000.000
3	1.160.000	1.700.000	2.450.000
5	530.000	760.000	1.040.000
10	2.000.000	3.000.000	2.263.000
Immuns			
IV	404.000	4.940.000	35.000
V	2.300.000	3.600.000	73.000
VII	1.208.000	2.604.000	164.000
VIII	2.157.000	5.753.000	855.000
IX	1.004.000	5.770.000	36.000

Tableau N° 29

Numéros des sérum	N _{max}	
	sérum frais	sérum après agglutination
Immun		
XI	1.498.000	1.332.000
Humains		
3	2.450.000	2.225.000
10	2.263.000	2.100.000

Tableau N° 30

Numéros des sérum	N ₄ /N ₃₇			N _{max}	
	sérum frais	sérum chauffé	sérum après adsorption sur les hématies A ₁	sérum frais	sérum après adsorption sur les hématies A ₁
V	1,9	1,25	1,06	73.000	22.000
VII	2,47	1,15	1,03	164.000	110.000

CONCLUSIONS

Ce travail a été entrepris dans le but d'identifier un inhibiteur de l'isohémagglutination mis en évidence par S. Filitti-Murmsen et Y. Jacquot-Armand d'une part et Zermati, Vargues et Lévy, d'autre part.

J'ai d'abord mis au point une technique personnelle quantitative de dosage du complément, consistant à déterminer le nombre maximum d'hématies de mouton sensibilisées qu'un sérum peut hémolyser, en mettant en présence pendant 60 minutes à 37°C une quantité fixe de sérum et des quantités croissantes d'hématies de mouton sensibilisées.

J'ai appliqué cette technique en premier lieu à l'étude de l'inhibiteur présent dans les sérums humains du sous-groupe A₁. Auparavant, pour prouver qu'il était indépendant de l'agglutinine, j'ai montré le rôle inhibiteur du sérum frais de donneurs appartenant au groupe AB (ce sérum ne renfermant ni agglutinine α ni agglutinine β). J'ai montré qu'après adsorption sur des hématies A₁ lavées, le rapport $\frac{N_4}{N_{37}}$ du nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C au nombre d'hématies agglutinées à 37°C devenait le même que pour les sérums chauffés 50 minutes à 56°C. J'ai dosé le complément dans le sérum avant et après adsorption et j'ai observé une baisse très nette du titre en complément.

Poursuivant l'étude de l'inhibiteur de l'hémagglutination, j'ai recherché si le complément jouait le même rôle dans l'immunagglutination. J'ai d'abord observé certaines propriétés des immunsérums. Le nombre d'hématies agglutinées par une quantité donnée de sérum augmente d'abord proportionnellement à la concentration des hématies ajoutées, pour atteindre une valeur constante. Cette valeur est toujours plus élevée lorsque l'agglutination est effectuée à 4°C plutôt qu'à 37°C.

Le chauffage pendant 50 minutes à 56°C du sérum est sans action sur le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4°C, mais il augmente de façon très notable le nombre maximum d'hématies agglutinées à 37°C. Le rapport N_4/N_{37} qui varie de 2 à 12 pour les sérums frais passe en moyenne à 1,17 pour le sérum chauffé.

J'ai mis ensuite en évidence la réversibilité de l'agglutination. A 37°C, le même taux d'agglutination est obtenu pour des concentrations données d'hématies et de sérum, que l'on mette en présence hématies et sérum, ou que l'on dissocie par dilution un agglutinat préalablement formé à des concentrations plus élevées. Le même taux d'agglutination est obtenu soit que l'on mette en présence hématies et sérum à 37°C, soit que l'on dissocie par dilution à 37°C un agglutinat préalablement formé à des concentrations plus élevées à 4°C.

J'ai étudié le comportement de l'agglutinine fixée dans un agglutinat à 37°C ou à 4°C. L'agglutinine fixée est éluée à 37°C, en agitant l'agglutinat et les hématies, séparés du sérum par centrifugation, avec un tampon physiologique. J'ai cherché le pouvoir agglutinant du liquide d'éluotion vis-à-vis de suspensions d'hématies à 4°C et à 37°C; j'ai trouvé pour le rapport N_4/N_{37} la valeur 1,05, valeur très peu différente de celle obtenue avec le sérum.

Enfin, j'ai poursuivi l'étude de l'inhibiteur de l'hémagglutination. Après adsorption du sérum sur les hématies A_1 lavées, le rapport N_4/N_{37} s'abaisse en moyenne à 1,1. D'autre part, soit après adsorption sur des hématies A_1 , soit après agglutination par des hématies B, on observe une baisse très nette du pouvoir hémolytique du sérum.

Ces résultats sont tout à fait en faveur de l'idée que le complément, ou l'un de ses composants, inhibe l'isohémagglutination et l'immunhémagglutination en recouvrant partiellement la surface des hématies.

BIBLIOGRAPHIE

1. S.Filitti-Wurmsers et Y.Jacquot-Armand. Etude quantitative de l'isohémagglutination. Réversibilité de l'isohémagglutination. Archives des Sciences Physiologiques/ 1,151,1947.
2. M.Millet et P.O.Hubinont. Sur un caractère différentiel des agglutinines naturelles et des agglutinines d'immunsérums. Ann.Inst.Pasteur. 79,737,1950.
3. S.Filitti-Wurmsers, Y.Jacquot-Armand et R.Wurmsers. L'énergie de liaison de l'isohémagglutinine aux hématies. C.R.Acad.Sc. 226,844,1948.
S.Filitti-Wurmsers, Y.Jacquot-Armand et R.Wurmsers. Sur l'énergie de combinaison des isohémagglutinines. C.R.Acad.Sc. 229,1173,1949.
4. S.Filitti-Wurmsers, Y.Jacquot-Armand et R.Wurmsers. Sur la différenciation des isohémagglutinines humaines par des grandeurs énergétiques. C.R.Acad.Sc. 230,683,1950.
5. S.Filitti-Wurmsers, Y.Jacquot-Armand et R.Wurmsers. Sur la combinaison des isohémagglutinines avec les groupes agglutinogènes. J.Chim.Phys. 47,419,1950.
6. S.Filitti-Wurmsers et R.Wurmsers. L'énergie de formation des complexes dissociables enzyme-substrat et antigène-anticorps. Biochim.et Biophys.Acta. 4,238,1950.
7. M.Zermati, R.Vargues et M.Lévy. Etude de l'agglutinabilité des hématies par les sérums antagonistes chez les sujets normaux et malades. C.R.Soc.Biol. 141,887,1947.
8. S.Filitti-Wurmsers et Y.Jacquot-Armand. Etude quantitative de l'isohémagglutination. C.R.Soc.Biol. 140,469,1946.
9. J.Bordet. Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Masson, édit. Paris.
10. L.Pillemer, E.E.Ecker, J.L.Oncley et E.J.Cohn. The preparation and physico-chemical characterization of the serum protein components of complement. J.Experim.Med. 74,297,1941.
11. P.Bruce-White. Observations on Salmonella agglutination and related phenomena. The influence of fresh normal serum on agglutination. J.Path.Bact. 34,23,1931.
12. Th.Thjötta et J.Jonsen. The influence of complement upon agglutination. Acta Path.Microb.Scand. 26,326,1949.

13. L.Pillemer, S.Scifter et E.E.Ecker. The role of the components of complement in specific immune fixation. J.Experim. Med. 75,421,1942.
 14. E.E.Ecker, S.Scifter et F.F.Dozois. Human complement. J.Lab.Clin.Med. 30,39,1945.
 15. J.Bordet et O.Gengou. Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. Ann.Inst.Pasteur. 15,289,1901.
 16. M.von Krogh. Colloidal Chemistry and immunology. J.Inf.Dis. 19,452,1916.
 17. S.C.Brooks. A theory of the mechanism of disinfection, hemolysis and similar processus. J.Gen.Physiol. 1,61,1918.
 18. M.M.Mayer, B.Eaton et M.Heidelberger. Spectrophotometric standardization of complement for fixation tests. J.Immunology. 53,31,1946.
 19. M.M.Mayer, A.G.Osler, O.G.Bier et M.Heidelberger. Activating effect of cations on complement. J.Experim.Med. 84,535,1946.
 20. M.Heidelberger et M.M.Mayer. Quantitative studies on complement. Advances in Enzymology. Vol. 8.
 21. R.Wurmser, S.Filitti-Wurmser et R.Briault. Sur la conservation du sang. Rev.Canad.Biol. 1,372,1942.
 22. MM.Mayer, C.C.Croft et M.M.Gray. Kinetic studies on immune hemolysis. A method. J.Experim.Med. 88,427,1948.
 23. G.Aubel-Lesure. Sur l'influence du complément dans l'agglutination des hématies. C.R.Soc.Biol. 144,472,1950.
-

